

43
2-g



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" ZARAGOZA "

DETERMINACION DE LOS VALORES DE REFERENCIA
DE HEMOGLOBINA GLICATADA (HbA_1) POR DOS
METODOS DE LABORATORIO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A ;
ELIZABETH ROMERO BENITEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

1.-	INTRODUCCION	1
2.-	FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA	30
3.-	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
4.-	OBJETIVOS	34
5.-	HIPOTESIS	35
6.-	MATERIAL Y EQUIPO	36
7.-	METODOLOGIA	38
8.-	RESULTADOS	50
9.-	DISCUSION DE RESULTADOS	58
10.-	CONCLUSIONES	61
11.-	APENDICE	63
12.-	BIBLIOGRAFIA	68

1. INTRODUCCION:

Estudios recientes indican que los métodos tradicionales de análisis de glucosa en sangre, en el control de la Diabetes Mellitus, tales como historia clínica, exámen médico y determinaciones de glucosa en orina y sangre, tienen un valor limitado (1-4).

Las células rojas normales contienen además de la Hemoglobina mayor (HbA), algunas fracciones menores como las Hemoglobinas Glicatadas (HbA_{1a}, HbA_{1b}, y HbA_{1c}), estas hemoglobinas representan aproximadamente el 97% de la Hb Total, mientras que la HbA₂ y la HbF representan el 2% y menos del 1% respectivamente (4-7).

El estudio de las Hemoglobinas Glicatadas se ha incrementado recientemente, ya que, se detectó que sus proporciones se elevan en la Diabetes Mellitus, en particular, la fracción HbA_{1c} (4-9). Este incremento no está relacionado con la edad del paciente, duración de la enfermedad, tipo de terapia o presencia de complicaciones características de la Diabetes Mellitus (5-10).

Por ello es que la determinación de hemoglobina Glicatada (HbG) está siendo utilizada con mayor frecuencia para el control de la Diabetes Mellitus. La determinación proporciona un índice de la concentración promedio de glucosa en sangre, correspondiente a los dos o tres meses precedentes a la toma de muestra, complementando así la rutina de control como la prueba de glucosa en orina y sangre (1,3,11,12).

La proporción de HbA_{1c} presente en individuos sanos es del 3-6% y de 20% o más en diabéticos mal controlados (1).

La siguiente tabla resume la actual nomenclatura establecida por el National Institute of Health, Diabetes Data Group (1).

HEMOGLOBINA

DESCRIPCION

HbA		Forma mayoritaria de Hb, tetrámero original, no modificado, constituido por dos cadenas α y dos cadenas β .
HbA ₀		El mayor componente de HbA, caracterizado por sus propiedades cromatográficas y electroforéticas. Modificaciones tales como la glicatación hace que exista esta fracción, sin embargo, no se afecta significativamente las propiedades de carga de la proteína.
HbA ₁		La fracción cargada más negativamente de la HbA, modificada post-translacionalmente. Se detecta por métodos cromatográficos y electroforéticos.
HbA _{1a1}	HbA _{1a2}	Diversos componentes de HbA ₁ , detectados por cromatografía.
HbA _{1b1}	HbA _{1b2}	
HbA _{1c}		Fracción formada por el enlace cetoamina de glucosa con un residuo de valina terminal de la cadena β .

....

Pre-HbA_{1c}

Forma lábil de la Hemoglobina - Glicata debido a un enlace al α Címina entre la glucosa y un residuo de valina de la cadena β.

Hemoglobinas Rápidas

Fracción total de HbA₁, que debido a su carga más negativa, migra rápidamente al ánodo durante la electroforesis y que incluye primero que HbA₀ por cromatografía.

Hemoglobina Glicata

Hemoglobina modificada por el enlace de glucosa en la cadena α y β en los residuos terminales de valina y los grupos ε amino de los residuos terminales de lisina.
Término genérico para designar a la hemoglobina que contiene glucosa u otros carbohidratos.

H E M O G L O B I N A S G L I C A T A D A S

HEMOGLOBINA	%Hb TOTAL	SUB-UNIDAD MODIFICADA	RELACION DE FOSFATOS POR DIMERO	NATURALEZA DEL LIGANDO UNIDO AL N-TERMINAL DE LA CADENA β DE LA Hb.	
HbA ₁	HbA _{1a1}	0.2	β	2	Hexosa difosfato Fructosa difosfato Glucosa-manosa-galactosa
	HbA _{1a2}	0.2	β	1	Hexosa monofosfato Glucosa 6-fosfato Glucosa-manosa-galactosa
	HbA _{1b}	0.5	β	0	Hexosa no fosforilada Producto de deaminación de HbA. Glucosa-manosa-galactosa
	HbA _{1c}	4-6	β	0	1-deoxy- β -D-Fructosil
	HbA _{1c}	0.2-0.6	β	0	ϕ -D-Glucopiranosil

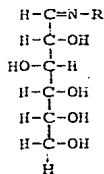
1.2 FORMACION DE HEMOGLOBINA GLICATADA

La reacción entre glucosa y HbA, es un ejemplo de glicatación no enzimática, la cual es lenta, continua e irreversible (5,7,9,13).

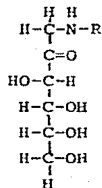
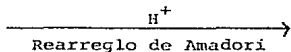
El eritrocito humano es permeable a la glucosa y durante sus 120 días de vida, en cada uno de ellos, se forma la HbG o HbA₁, a partir de HbA, a una velocidad que depende de las concentraciones de glucosa (2,4,14,15,16), por tal motivo, la determinación de HbA₁, refleja el nivel promedio de glucosa en sangre durante las semanas precedentes a la toma de muestra (1,4,11,17,18).

En la HbG la glucosa se halla atacando al grupo NH₂ terminal (de un residuo de valina) de una o ambas cadenas β de la HbA (1,6,11), sin embargo, la HbA puede ser glicatada en otros sitios del final de la cadena β, por ejemplo, residuos de lisina (1,14,17).

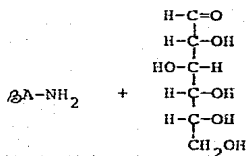
La formación de HbG es un proceso en dos etapas, con la formación inicial de un intermediario, una Base de Schiff de glucosa y HbA, este compuesto lábil, llamado Pre-A_{1c} se forma cuando la glucosa ataca al grupo NH₂ terminal de la valina de la cadena β, posteriormente es ta aldimina, sufre una reacción molecular irreversible para formar HbG (una cetoamina) a través de un Rearreglo de Amadori (5,6,13,16,19), o bien se disocia en glucosa y HbA. La probabilidad de que Pre-A_{1c} se disocie es seis veces mayor a que sufra un Rearreglo de Amadori (17).



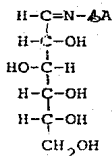
BASE SCHIFF



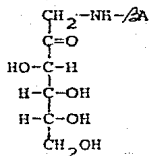
CETOAMINA
(HbA_{1c})



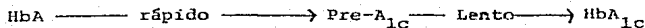
GLUCOSA



ALDIMINA
BASE DE SCHIFF



CETOAMINA
REARREGLO DE
AMADORI



La producción de HbA_{1a} , HbA_{1b} , y HbA_{1c} , es un proceso postranslaccional, que ocurre, a lo largo de la vida de la célula roja, según lo demostraron Bunn y Fitzgibbons (7).

Las HbA_{1a1} , HbA_{1a2} y HbA_{1b} , son uniones de Hb con metabolitos de azúcares encontrados en las células rojas humanas. HbA_{1a1} y HbA_{1a2} son uniones de HbA con fructosa 1,6 difosfato y con glucosa 6 fosfato, respectivamente. Mientras que la estructura de HbA_{1b} se desconoce, en ésta la modificación es en la cadena α_2 pero no sobre el grupo NH_2 del aminoácido terminal (5).

La razón de que estas hemoglobinas menores se encuentren sólo ligeramente aumentadas en pacientes diabéticos, se debe a que las cantidades de todas las HbC, están determinadas por la concentración de los diversos azúcares en la célula roja y por la velocidad a la cual éstos reaccionan con la Hb. De tal manera, que si la concentración de glucosa 6 fosfato es de 1/200 que de glucosa, pero su velocidad de reacción es diez veces más rápida que con la glucosa, es de esperarse, que la proporción de HbA_{1a2} / HbA_{1c} sea de 1:10, lo cual es congruente con la proporción de las distintas Hbs menores determinadas en una muestra de sangre (5).

El hecho de que HbA_{1c} , se acumula durante toda la vida de las células rojas, explica porque las células rojas jóvenes, aisladas por gradiente de concentración, tienen bajas concentraciones de HbA_{1c} , que las células rojas viejas y porque pacientes con células rojas de corta vida (anemia hemolítica), tienen mucho menos HbA_{1c} en comparación con individuos sanos (5,16).

AZUCARES DE LA CELULA ROJA HUMANA NORMAL (5).

COMPONENTE	CONCENTRACION (M)	REACTIVIDAD CON HEMOGLOBINA
Glucosa	4100	+
Glucosa 6 Fosfato	28	++
Glucosa 1,6 Difosfato	150	0
Fructosa 6 Fosfato	10	++
Fructosa 1,6 Difosfato	5	++
Ribosa 5 Fosfato	10	++

1.3 VALORES DE REFERENCIA.

Una amplia variación se ha reportado para determinar los niveles de HbG, debido en su gran mayoría, a la presencia de cantidades variables de Pre-A_{1c}, sobretodo, en pacientes diabéticos mal controlados, quienes han presentado amplias fluctuaciones de glucosa sanguínea, y por lo tanto, el nivel de Pre-A_{1c}, puede ser muy variable. En contraste con el nivel de HbA_{1c} que es estable y cambia lentamente (17).

En pacientes diabéticos mal controlados, puede haber alrededor del 20% de HbA₁, comparada con el 5-8% encontrado en individuos sanos. Los individuos sanos presentan valores de 3-7% de HbA_{1c} y de 4-8% de HbG total. En los diabéticos mal controlados la proporción de HbA_{1c} es de 7 a 12% con niveles de HbG total de 10-20% (5,11,17).

PORCENTAJES DE Hb TOTAL (5).

HEMOGLOBINA	PORCENTAJE DE Hb	
	NORMAL	DIABETICO
A _{1a1}	0.19 [±] 0.02	0.20 [±] 0.03
A _{1a2}	0.19 [±] 0.04	0.22 [±] 0.04
A _{1b}	0.48 [±] 0.15	0.67 [±] 0.30
A _{1c}	3.30 [±] 0.30	7.50 [±] 2.00
A	96.00	80 a 90

1.4 METODOS DE DETERMINACION DE HbG

Cromatografía de Intercambio Iónico.

Este es el método más extensamente utilizado en los laboratorios. El principio en el cual se basa este método es que la mayoría de las especies de HbG, incluyendo HbA_{1c}, están menos cargadas positivamente a pH neutro, - en comparación con HbA₀, por lo tanto, HbA_{1c}, HbA_{1b} y -- HbA_{1c}, eluyen primero que la fracción principal de HbA, la HbA₀, al usar amortiguadores con distinto pH. De tal manera, que los porcentajes de ellas en la Hb Total pueden ser determinados por espectrofotometría (1,7,17,19). Algunos métodos sólo separan HbA₁ (HbA_{1a+1b+1c}) de HbA₀ (1,4,5,7,9,19).

No obstante, ser un buen método, el tiempo de chromatografía es largo para poder ser aplicado rutinariamente a gran escala (7-15). A parte de ello, la reproductibilidad técnica depende en gran medida de la fuerza iónica, - y temperatura (4).

Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPCL).

En general, los métodos de cromatografía a alta presión muestran excelente correlación en el análisis de -- HbG y permite, una rápida separación de HbA_{1c} de los --- otros componentes menores de HbA₁ (21).

Comúnmente se usa un sistema de dos amortiguadores. La absorción del eluido es controlada continuamente permitiendo cuantificar cada componente (1,15,20,21,22).

Este método puede ser completamente automático, no obstante las ventajas, HPCL requiere meticolosas técnicas de laboratorio para lograr y mantener óptimos resultados, además de ser muy costoso el equipo que se requiere (1,7,15,23).

Para los métodos de cromatografía señalados existen factores que afectan los resultados, entre ellos se encuentran los factores propios del análisis y aquellos que se relacionan con algunas características de la muestra (1).

Los factores de análisis incluyen temperatura, pH, fuerza iónica y tamaño de la columna (1,16,17).

En relación a las características de la muestra se encuentran.

Intermediarios lábiles.

El compuesto lábil Pre-A_{1C} sufre una reacción molecular irreversible para formar HbG, o se disocia en glucosa y HbA. La proporción de este intermediario depende de la concentración de glucosa, por lo tanto, en la cromatografía de HbG, puede existir un falso incremento en los resultados de HbA_{1C}, por lo que debe eliminarse el intermediario antes del análisis (1,17).

Anemias Hemolíticas y Embarazo tienden a disminuir los resultados de HbG (1).

Hemoglobinopatías.

Diversas variantes de Hb se asocian con el incremento o disminución de los valores de HbG, dependiendo

de las características de carga de la partícula varían-
te. La HbF eluye con las hemoglobinas rápidas incremen-
tando aparentemente la concentración de HbA_{1c} sobre HbA₁
(1,7,16,17,19,23). En el caso de HbC y HbS disminuye --
falsamente los resultados de la determinación (1,7,16).

Interferencia de Sustancias.

En presencia de altas concentraciones de triglicéridos o bilirribinas aumentan falsamente los resultados de HbA₁ y HbA_{1c} (1).

Enlaces o unión de la Hb con otras sustancias que -
no son glucosa.

Varias sustancias aparte de azúcares pueden unirse a la Hb, alterando así, sus características de carga. Estas uniones eluyen junto con las Hb menores aumentando los resultados del análisis. Esto incluye situaciones como adicción al opio, alcoholismo, tratamientos largos -- con grandes dosis de aspirina, y de manera especial en -- casos de uremia donde los valores de HbG pueden estar -- aparentemente elevados, no obstante una tolerancia normal a la glucosa (1,11,16,17,19).

Manejo y almacenamiento de la muestra.

En muestras almacenadas por arriba de los 4°C, las fracciones HbA_{1a+b} tienden a incrementarse dependiendo de la temperatura y el tiempo. HbA_{1c} sólo se afecta ligeramente, de tal modo, que los métodos que determinan HbA₁ presentan valores aumentados, si las muestras no se almacenan correctamente (1,7).

Afinidad Cromatográfica.

La afinidad cromatográfica es un método para separar grandes moléculas con base en su estructura química.

La fase estacionaria, la cual esta empaquetada en -- una columna, es una matriz insoluble, semejante a la celu losa o agarosa, con un ligando apropiado. Cuando la fase móvil, conteniendo las sustancias a separar, se pasa atra vés de la columna, las sustancias se separan de acuerdo a las diferentes interacciones con el ligando. Para la cuan tificación de HbG la matriz más empleada es agarosa y el ligando ácido m-aminofenil borónico. De esta manera las - HbG al contener los grupos cis-diol en la unión con la -- glucosa, forma anillos complejos con el ácido borónico -- (1,4).

El hemolizado se prepara directamente con sangre to tal, o paquete de eritrocitos, y se aplica a la columna, - para lavarla con dos amortiguadores diferentes. El primer amortiguador eluye la fracción no glicatada, la cual no - posee grupos cis-diol y por lo tanto no se une al ácido - borónico. La otra porción rica en HbG se eluye con el se gundo amortiguador que comúnmente contiene sorbitol, un - azúcar-alcohol que desplaza la HbG de la columna (1).

Actualmente existen en el comercio Kits que contie -- nen las columnas preempaquetadas y los amortiguadores --- apropiados (1,7). Los análisis, sin embargo, son sensi --- bles a las cargas menores debido a las propiedades del -- gel tales como concentración del ligando y en especial -- presenta gran dependencia a la temperatura.

Tales sistemas son caros, y por lo tanto, sólo son -

convenientes para laboratorios que llevan a cabo gran número de determinaciones.

Los análisis presentan pequeños efectos en relación al manejo y almacenamiento de la muestra. Las bases de Schiff, intermediarios lábiles no interfieren, tampoco lo hacen las hemoglobinopatías, ni HbF, ni las uniones de Hb con otras sustancias que no sean glucosa (1,4).

Los resultados correlacionan bien con los métodos colorimétrico del Ácido Tiobarbitúrico (TBA) e intercambio iónico.

Recientemente se han propuesto métodos de afinidad cromatográfica, en los cuales, las muestras se recolectan en capilares y papel filtro para su análisis, sin embargo, su uso aún es muy limitado (20,24,25,26).

Electroforesis.

El más reciente método de análisis, para la determinación de HbA₁, es la electroforesis en agar, que está basada en la afinidad que presenta la HbA, por los grupos fosfato o sulfato a través del N-terminal del residuo de valina en la cadena α , sitio blanco para la glicatación. Por tanto, al usar un método de agar con alto contenido de sulfatos, la HbA será adsorbida, pero no así la HbA₁, la cual tiene el N-terminal ocupado con un residuo de glucosa. El movimiento a través del gel, por electroforesis, separa las fracciones glicatadas de las no glicatadas, lo cual permite la determinación densitométrica de las bandas (1,11).

La presencia del intermediario lábil, generalmente no interfiere con la interpretación de los niveles de HbA_1 . Cuando se requiere por ejemplo, en pacientes con altos niveles de HbA_1 , o en niños con grandes fluctuaciones de niveles de glucosa en sangre, el intermediario puede eliminarse fácilmente con la incubación de los eritrocitos en solución fisiológica (4,7,13,19,27,28).

Los valores de HbG son expresados como un porcentaje de la Hb Total. Los valores de referencia reportados por Gelman Sciences con el método electroforético, es de aproximadamente 7-12% para la HbA_{1c} y de 10 a 20% para HbA_1 (HbG total) en pacientes diabéticos no controlados (11).

La glicatación de la Hb ocurre durante los 120 días de vida del eritrocito. Por tanto, los niveles de HbG reflejan un promedio de los niveles de glucosa sanguínea durante un período de 3 a 4 semanas, pequeñas fluctuaciones no son detectadas por los niveles de HbA_1 , pero sí cambios prolongados por más de una semana (11).

Entre las ventajas que presenta el método electroforético en relación con los otros métodos existentes para la determinación de HbA_1 se puede mencionar:

Variaciones pequeñas en el pH, fuerza iónica o temperatura no afectan la determinación (1,4,11,12, 18,29,-30).

Las determinaciones realizadas por electroforesis correlacionan bien con otros métodos, por ejemplo HPCL, Cromatografía en Columna de Intercambio Iónico (12,18).

El método electroforético proporciona una presenta-

Las características de migración electroforética de HbA y HbA₁ son esquematizadas a continuación:

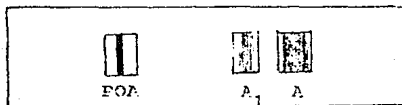


Fig.A Esquema que representa el corrimiento electroforético en forma de bandas de HbA y HbA₁.
(POA = Punto de aplicación)

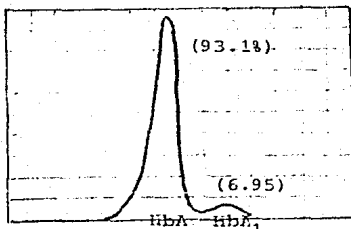


Fig.B Lectura densitométrica - del ejemplo mostrado en la Fig.A.

ción visible y permanente de A_0 y A_1 , separación que es fácilmente medida (11,30).

La determinación no se afecta por concentraciones - de triglicéridos (1,18,30).

Cuando la muestra no se analiza el mismo día de la toma de muestra, se puede almacenar en forma de hemolizado a 4°C hasta por tres días, para evitar colapso de A_1 sobre A_0 (12).

No existe interferencias de HbS ó C (1,11,18,29).

En caso de alguna hemoglobinopatía HbS ó HbC se separan en fracciones distintas, a saber, A_1 , S_1 , A_0 y S_0 ó A_1 , C_1 , A_0 y C_0 según el caso (4,29).

El método electroforético es sencillo, rápido y requiere sólo una pequeña habilidad técnica (12).

El análisis requiere equipo específico y relativamente caro, pero puede analizarse muchas muestras en un pequeño período de tiempo dado (11,18,30).

Uno de los inconvenientes en el uso del método electroforético es que la precisión es ligeramente menor que la obtenida por métodos cromatográficos (12).

Potencial Isoeléctrico.

Es un tipo especial de electroforesis, que mediante el uso de geles de poliacrilamina separa las hemoglobinas de acuerdo a su punto isoeléctrico (1,4,17,19). El hemolizado se somete a una corriente eléctrica en el gel preparado para tener un gradiente de pH. El gradiente de pH se logra mediante acarreadores especiales "anfolitos".

Cada componente de Hb forma una banda única en el gel en su punto isoeléctrico específico (7).

La HbA_{1c} forma una banda bien definida y delimitada de HbA₀ y de otros componentes menores de la Hb. Las hemoglobinopatías no afectan los resultados, pero sí Pre-A_{1c} (7,19,24). Los resultados correlacionan bien con otros métodos (1).

El equipo necesario es costoso, y aún no es usado con frecuencia.

Método Colorimétrico.

El método colorimétrico más extensamente utilizado es el Hidroximetilfurfural (HMF) o Método del Acido Tiobarbitúrico (TBA) (1).

Fiückiger y Winterhalter (17) realizaron una determinación colorimétrica de HbG, tomando en cuenta, el hecho de que cuando se somete la HbA_{1c} a una ligera hidrólisis ácida, se libera 5-HMF de la proteína, que al combinarse con ácido tiobarbitúrico (TBA), forma un producto colorido con un pico típico de absorción a 443 nm (1, 5,7,16,17,31).

Este método se ha adaptado para uso rutinario y generalmente de resultados confiables (17) que correlacionan bien con otros métodos (31).

El método del TBA tiene varias ventajas sobre los métodos de cromatografía y electroforesis. Debido a que es específico para la unión cetoamina, y no se afecta -- por la presencia de HbF, hemoglobinopatías y modificacio

nes postraslacionales de la Hb con otras sustancias, y lo más importante, por la fracción Pre-A_{1c}. Por lo tanto, no es necesaria la preparación del hemolizado exento de Pre-A_{1c} (8, 16, 17).

Una desventaja del método es que puede resultar valores falsos altos debido a la formación de S-HMF a partir de la condensación de glucosa libre en altas concentraciones con hemoglobina (17), sin embargo, la glucosa libre que interfiere, se elimina bajo condiciones cuidadosas de análisis (1).

Se desconoce si HbA_{1a1} y HbA_{1a2} y las fracciones HbA_{1b} son codeterminadas con este método (4).

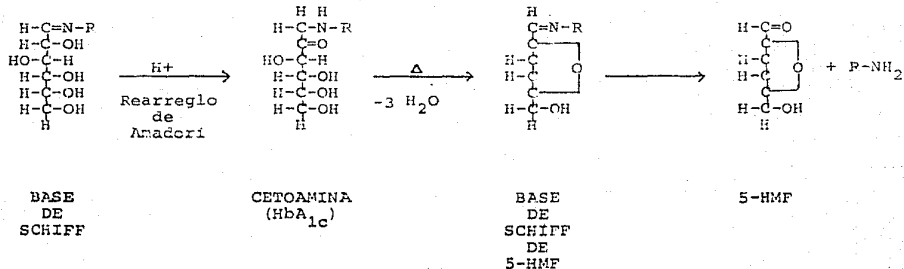
Un inconveniente adicional, es que en los análisis de HbG, las unidades reportadas son diferentes de Laboratorio a Laboratorio. Por ejemplo, nanomoles de HMF por mg de Hb o equivalentes de fructosa por mg. de Hb. Dificultando así comparar resultados de dos laboratorios distintos (1).

La reacción del TBA es específica para la determinación del ligando carbohidrato-residuo de proteína.

En presencia de ácido oxálico, el cual promueve el Rearreglo de Amadori, el equilibrio está dado hacia la forma cetoamina, que al someterse a calentamiento se deshidrata produciendo la liberación de S-HMF.

Radioinmunoensayo.

Se han realizado otros estudios para la determinación de HbA_{1c}. Moor et. al. (4) incluyen un análisis de



Liberación de 5-HMF a partir de una Base de Schiff.

radioinmunoensayo y análisis espectrofotométrico que se basa en los cambios de absorción presentes cuando la Hb está ligada a polifosfatos orgánicos. La experiencia práctica con este método es aún muy limitada (17).

Por otra parte, Javid et ali. (7) llevaron a cabo un método de radioinmunoensayo, con la obtención de anticuerpos Anti- A_{1c} en carnero, sin embargo, el método no se haya aún disponible comercialmente (4).

Selección del Método de Análisis.

Con el gran número de métodos de análisis de HbC disponibles, hoy en día, puede ser difícil seleccionar uno apropiado. Existen grandes debates concernientes a los méritos relativos a cada método. Sin embargo, cada uno de los métodos posee ciertas ventajas y desventajas, ninguno es considerado el "mejor". Todos los métodos ofrecen información clínica comparable si se realizan adecuadamente (1,32).

Para cada laboratorio la elección del método depende de varios factores, incluyendo costos, número de muestras a analizar, detalles en el manejo de la muestra y características de la población de pacientes, por ejemplo predominio de hemoglobinopatías (1,16).

Frecuencia del Análisis.

Para uso de rutina clínica la determinación se deberá realizar cada 3 ó 4 semanas. El análisis no es útil -

para el control diario de glucosa, por tanto, no reemplaza los análisis de glucosa en orina y sangre (1).

Sin embargo, cambios significativos en el control de la glucosa pueden detectarse más rápidamente determinando HbG. Por ejemplo, un cambio plasmático de glucosa de 300 mg/dl (un nivel no raro en la mayoría de los pacientes diabéticos) a 100 mg/dl. se asocia con una disminución de la concentración de HbG, alrededor del 1% en una semana y de 3% ó más durante un mes(1).

Los valores de HbG se deben obtener con intervalos de 2 a 4 semanas en situaciones clínicas como Diabetes - Gestacional o después de cambios significativos en la terapia (1).

CUADRO COMPARATIVO DE LOS METODOS COMUNMENTE EMPLEADOS PARA LA DETERMINACION DE HbA_{1c}.

METODO	PRECISION	COMPONENTES DETERMINADOS	INTERFERENCIA POR			COSTO EQUIPO	COMENTARIOS
			Pre-A _{1c}	HEMOGLOBINOPATIAS	UNIONES Hb-No glucosa		
CROMATOGRAFIA							
Microcolumna Intercambio Iónico	Buena	HbA ₁ , HbA _{1c}	Si	Si	Si	Moderado-Alto	El análisis se efectúa por cambios de pH, y temperaturas. Los resultados se aumentan por Pre-A _{1c} en casos de uremia, alcoholismo, altas dosis de aspirina y condiciones de almacenamiento del hemolizado.
HPCL	Excelente	HbA _{1c} , HbA _{1a+b}	Si	Si	Si	Alto	
ELECTROFORESIS							
Gel agarosa	Buena	HbA ₁	Si	No	Si	Moderado	Los resultados son --- aumentan por Pre-A _{1c} --- que puede ser eliminada por incubación en sol. salina.
Potencial Isoeléctrico	Buena	HbA ₁	Si	No	¿No?	Moderado-Alto.	
COLORIMETRICO	Buena	HbA ₁ (cetosaínas)	No	No	No	Bajo	Las condiciones de hidrólisis se deben cuidar para la alta precisión. Las muestras son muy estables durante su almacenamiento como hemolizado.
AFINIDAD CROMATOGRAFICA	Buena	HbA ₁ (Enlaces Cis-Diol)	¿No?	No	No	Moderado - Alto	Las características del gel varían según el fabricante. El intermedio Hb Pre-A _{1c} puede interferir en algunos geles. Las muestras son estables al almacenaje.

1.5 APLICACIONES

Valor de la información proporcionada por la determinación.

Aunque no es posible determinar con precisión matemática la relación, entre las concentraciones de HbG y la -- concentración de glucosa en plasma, varios estudios indican la existencia de una relación lineal entre ambas, teniendo en cuenta que el valor de HbG, es más bajo que el promedio de glucosa plasmática (1).

Cada cambio de 1% de HbG representa a su vez un cambio de 25 a 35 mg/dl en la glucosa plasmática (1).

Un valor normal de HbG indica, que en promedio la concentración de glucosa plasmática durante las semanas precedentes e incluso meses, estuvo dentro de los límites normales. El resultado de la prueba, no obstante, no indica la existencia debido a períodos de hipo e hiperglucemia (1).

Diagnóstico de Diabetes Mellitus.

Una importante área de aplicación en la determinación de HbG, es el diagnóstico de Diabetes Mellitus. Comúnmente suelen emplearse para el diagnóstico determinaciones como glucosa plasmática en ayunas y/o curva de tolerancia a la glucosa, que en algunas ocasiones muestran resultados falsos positivos, además de requerir esta última, una preparación previa del paciente antes de la toma de muestra (1,5, 16, 35, 36).

El uso de la HbG para el diagnóstico requiere recolectar solamente una muestra de sangre a cualquier hora del día, sin considerar el tiempo de ingestión de alimentos - (1,16,36).

Con el empleo de la HbG es posible, ahora estimar -- más exactamente y con mayor grado de sensibilidad la presencia de intolerancia a la glucosa, particularmente en - los casos límite (16,36).

Dada la inexactitud de las determinaciones urinarias y la pobre especificidad de la sintomatología, así como - de la esporádica y al azar determinación de las concentra - ciones de glucosa sanguínea en ayunas, en la que esta úl - tima sólo representa la medida de puntos simples en un - tiempo dado de los continuos y constantes cambios de la glucosa en sangre de individuos diabéticos (3,16). El em - pleo de la determinación de HbG proporciona un índice de la concentración promedio de glucosa en sangre, dicho índi - ce no es afectado por cortas fluctuaciones (en tiempo) en la glucosa sanguínea y por consiguiente refleja de manera relativamente precisa el control de la glucosa sanguínea en la Diabetes Mellitus, durante los 3 ó 4 meses preceden - tes a la toma de muestra (2,5,37).

La determinación de HbG es muy útil en situaciones - no poco frecuentes, en las cuales, la impresión clínica - sugiere un satisfactorio control diabético, y no obstante, los valores de HbG están marcadamente elevados, esto ayu - daría a evitar cambios inadecuados en la terapia que con seguridad deteriorarían la salud del paciente (2,10).

También se ha considerado de utilidad en la Diabetes Gestacional que es una frecuente complicación durante el

embarazo, dicha alteración del metabolismo ocasiona macrosomía fetal, es por tal motivo que la determinación de HbG es empleada como un indicador del control durante la Diabetes Gestacional (38-41).

Uso de HbG para establecer objetivos de atención.

Varios estudios sugieren que el grado de hiperglucemia crónica es un importante factor de riesgo para el desarrollo de las complicaciones diabéticas, es por ello, que el nivel de HbG deberá figurar como un objetivo de atención dentro de la atención integral en el control de la Diabetes Mellitus (1).

Desafortunadamente este objetivo no es realista para todas las personas con Diabetes Mellitus. Para la mayoría de las personas con Diabetes Tipo I (Insulinodependientes) los esfuerzos por conseguir una proporción normal de HbG, puede ocasionar serios cuadros de hipoglucemia. Sin embargo, muchas personas con Diabetes Tipo I bien motivadas, pueden con toda seguridad conseguir y mantener valores de HbG, dentro del 0.5-2% en relación a los valores normales (correspondiendo tales valores a una concentración promedio de glucosa en plasma menor de 150 mg/dl. (1,2,4,16, 42).

En pacientes que no requieren inyecciones de insulina o sólo requieren en pequeñas dosis (menos de 0.5 Unidades/Kg P.), los valores de HbG más próximos o dentro del rango normal, son considerados metas realistas (1,2,4,16, 42).

De esta manera, la HbG proporciona una estimación - objetiva y exacta de la efectividad de la terapia diabética y puede guiar para el mejor control de la Diabetes Mellitus.

La determinación de HbG puede ser realizada para reforzar la atención del paciente diabético, puesto que el resultado de este análisis proporciona a cada paciente - un panorama general del objetivo o logro alcanzado con el tratamiento dietoterapéutico seguido. Como los pacientes se comienzan a familiarizar con la información que les proporciona la determinación, presentan un mayor interés por los resultados a alcanzar (1,2).

Uso de la HbG como un indicador para evitar las complicaciones en la Diabetes Mellitus.

La determinación de HbG puede ser útil para responder a una de las preguntas fundamentales en el control de la Diabetes Mellitus, en relación a que las complicaciones más frecuentes en la Diabetes están relacionadas con el grado de control de la hiperglucemia (17,27).

Distintas investigaciones han establecido el hecho que altas concentraciones de glucosa son determinantes para el desarrollo de las complicaciones más frecuentes en la Diabetes, como son las nefropatías, retinopatías, neuropatías y arterioesclerosis, aumentando los índices de morbi-mortalidad en la población diabética (16).

El riesgo de las complicaciones diabéticas es reducido por un buen control de la glucemia (4,10,16,27).

Cabe señalar, que las mismas reacciones químicas, - que se presentan en la glicatación de la hemoglobina, -- pueden causar modificaciones similares en los tejidos -- comprometidos en las complicaciones de la Diabetes Mellit^us. Numerosas proteínas además de la hemoglobina, son - modificadas por glicatación. Ejemplos incluyen proteínas de la membrana de la célula roja, albúmina, otras proteiⁿas séricas, colágeno y cristalino. Dichas modificacioⁿes causan efecto sobre el comportamiento funcional del tejido modificado y teniendo en cuenta su carácter irre^versible el efecto será acumulativo (6,2,17).

De tal manera, que la HbC es un útil modelo de gli^catación no enzimática de otras proteínas que pueden estar implicadas en las complicaciones crónicas de la en^fermedad (4,5).

2.0 FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Investigaciones recientes indican que la Hemoglobina Glicatada está siendo utilizada con mayor frecuencia para el control de la glucosa sanguínea en pacientes diabéticos (1-3).

El término "Hemoglobina Glicatada", se refiere a la unión de Hemoglobina A y glucosa, a través de una reacción no enzimática, continua, lenta e irreversible que depende de las concentraciones de glucosa sanguínea y -- que se lleva a cabo a lo largo de los 120 días de vida -- de la célula roja normal (1-8).

La determinación de la Hemoglobina Glicatada, proporciona un índice de la concentración promedio de glucosa sanguínea durante los dos o tres meses precedentes -- (1,3,4,5,8,9), permitiendo de tal manera, junto con las pruebas de glucosa en orina y sangre, evaluar el estado metabólico de los pacientes diabéticos (1,2,6,9,11).

El componente de la Hemoglobina, útil en relación a la Diabetes Mellitus, es la fracción HbA_{1C} , que es el -- más abundante de los componentes minoritarios de la Hemoglobina en los eritrocitos humanos (3,6), dicha fracción HbA_{1C} , se forma por la unión de la glucosa y un grupo NH_2 terminal de un residuo de valina de una o ambas cadenas de la HbA. (1,2,3,6,7.), a través, de una unión cetamina (3,6,7,8).

Dependiendo del método de análisis se ha reportado que la proporción de HbA_{1C} es del 3 al 6% en personas sa

nas (6,7) y del 6% al 20% o más en personas diabéticas - (1,2), con respecto a la Hemoglobina Total, sin embargo, se hace necesario establecer los valores de referencia - en la población mexicana.

La determinación de la Hemoglobina Glicada posee importantes áreas de aplicación como por ejemplo:

Diagnóstico de Diabetes Mellitus.

Evaluación del control glicémico en pacientes diabéticos, principalmente en aquellos con terapia insulínica, a fin de efectuar las medidas correctivas - en dicha terapia en caso de ser necesario.

Detección oportuna del mal control en diabéticos -- aparentemente bien controlados, para evitar las complicaciones más frecuentes.

Control de Diabetes Gestacional (1,3,4,9,11).

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la importante información que proporciona la Hemoglobina Glicada como un indicador seguro en el control de la glucosa en pacientes diabéticos (1-5,8,9,-11), es necesario establecer los valores de referencia, y por ello debe contarse con el (los) método (s) de análisis óptimo (s) de acuerdo, a las necesidades y condiciones con las que cuenta el Laboratorio de Análisis Clínicos.

Existen diversos métodos para la determinación de Hemoglobina Glicada, entre los cuales se encuentran -- (1-3,5,68) :

Métodos basados en la diferencia de carga:

- Cromatografía de columna de intercambio iónico.
- Cromatografía de líquidos a alta presión.
- Electroforesis.

Métodos basados en la reactividad química

- Método colorimétrico del Ácido Tiobarbitúrico (TBA).

Métodos basados en diferencias estructurales.

- Afinidad cromatográfica.

De acuerdo con bibliografía reportada, todos los métodos ofrecen información clínica comparable (1,3,7,8).

En el presente trabajo se eligieron los métodos de electroforesis (2,5) y el colorimétrico del ácido tiobarbitúrico, con el fin de evaluar el más adecuado dadas --

las condiciones y necesidades del Laboratorio, de acuerdo a factores tales como, número de muestras a analizar, detalles inherentes al manejo de la muestra, características de la población, costo; a su vez que se determinan -- los valores de referencia.

4. O B J E T I V O S

- 1.- Evaluar la sensibilidad de un método colorimétrico (TBA) comparado con un método electroforético para la medición de HbA_{1c} en el Laboratorio Clínico.
- 2.- Determinar los valores de referencia de HbA_{1c} para ambos métodos (colorimétrico y electroforético).
- 3.- Determinación de HbA_{1c} en pacientes diabéticos de diferente tiempo de evolución, como un método de control al tratamiento de la Diabetes Mellitus.

5. H I P O T E S I S

Sí la idiosincracia y el tipo de alimentación del pueblo mexicano, es diferente a la de --- otras ciudades, donde se han realizado los estudios de valores de referencia para Hemoglobina glicatada en individuos diabéticos, al emplearse los métodos colorimétrico y electroforético para la determinación de este compuesto en pacientes diabéticos mexicanos, entonces, obtendremos unos valores de referencia específicos para la Ciudad de México.

6. MATERIAL Y EQUIPO

Material Biológico.

100 muestras de sangre total de individuos sanos.

150 muestras de sangre total de individuos diabéticos.

Equipo.

Balanza Granataria Chaus Cap. 5 lb.

Balanza Analítica Mettler Mod. H80

Centrífuga Solbat Mod. J-12

Estufa Riossa Mod. EG

Autoclave

Agitador Vortex-Genie

Baño María Riossa Mod. MT-4

Spectronic-20 Bausch-Lomb

Refrigerador American

Fuente de poder

Eliminador de picos de voltaje

Equipo de electroforesis Gelman Sciences

Densitómetro Quick-Scan Helena Laboratories

Material de vidrio.

Tubos de ensayo 13x100

Tubos de ensayo 13x100 con tapón de baguelita

Pipetas graduadas de 0.1, 1.0, y 2.0 mls.

Pipetas pasteur

Matraz aforado de 100 y 1000 mls.

Laminillas de vidrio

Vasos de precipitados de 250 y 500 mls.

Tubos capilares

Probeta de 100 mls.

Frasco de vidrio capacidad 5 lts.

Reactivos líquidos.

Tetracloruro de carbono Baker
Acido acético Baker
Glicerol Baker

Reactivos sólidos.

Acido Tiobarbitúrico Laboratorio de Investigación -
Química Orgánica INEP Zaragoza
Glucosa Baker
Manitol Baker
Citrato de sodio Baker
Acido oxálico Baker
Acido tricloroacético Baker
Cianuro de potasio Baker
Fosfato trisódico Merck
Fosfato sódico monobásico Prod. Quim. Monterrey
Fosfato sódico dibásico Baker
Sulfato de cobre Baker
Carbonato de sodio anhidro Merck
Carbonato de sodio Merck
Aguina Sigma Chemical
Penicilina Lakeside
Estreptomycin Lakeside
EDTA Prod. Quim. Monterrey.

Equipo Comercial para la Determinación de Glucosa
Método GOD-PAP. Merck.

Reactivo de color
Solución patrón

Equipo de Electroforesis Gelman Sciences

Membrana Super-Sepraphore Gelman Sciences
Colorante Ponceau S Gelman Sciences
Solución Aclarante Gelman Sciences
Buffer Glyco-Phore Gelman Sciences

Soluciones.

Solución Citrato de sodio
Solución Amortiguadora de fosfatos
Solución Salina 0.85%
Solución de Cianuro de potasio 4%
Solución Amortiguadora de fosfatos pH 7.4
Solución Amortiguadora de fosfatos pH 7.1
Solución Amortiguadora de fosfatos pH 7.1-Glicerol (2:8)
Reactivo Cualitativo de Benedict
Solución EDTA
Solución Ácido oxálico
Solución Ácido Tiobarbitúrico 0.05 M
Solución Ácido tricloroacético 40%
Solución Ácido acético 5%
Solución Amortiguadora Glycophore

7. METODOLOGIA

Obtención del Patrón de Hemoglobina Glicatada.

Obtener muestras de sangre venosa de individuos sanos utilizando citrato de sodio como anticoagulante.

Separar los eritrocitos por centrifugación a 3000 rpm. durante 10 min.

Colocar 0.25 mls. de eritrocitos en tubos de ensaye que contengan 0.3 mls. de medio de incubación BACPM (Sistema Amortiguador de Bicarbonatos).

Incubar a temperaturas de 4° y 36°C durante 6, 18, y 24 hrs.

Después de la incubación, separar los eritrocitos del medio de incubación por centrifugación, durante 10 min. a 3000 rpm. Lavar dos veces con solución salina isotónica, y lisar con adición de 0.2 mls. de agua destilada, agitar suavemente durante 5 min. y agregar 0.1 mls. de KCN al 4%.

Extraer los lípidos presentes en la muestra adicionando 1.0 ml. de CCl_4 con agitación vigorosa a lo largo de 5 min. y eliminar la fase no polar.

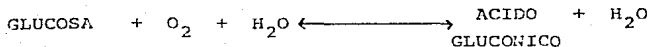
Dializar los hemolizados durante 24 hrs. con Solución Amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Durante ese tiempo realizar la prueba cualitativa de Benedict a la Solución Amortiguadora de fosfatos pH 7.4 empleada en la diálisis con el fin de determinar el término de la misma.

Diluir los hemolizados dializados con 0.2 mls. de una mezcla de Amortiguador de Fosfatos pH 7.1 y glicerol (2:8), almacenar en refrigeración hasta su análisis colorimétrico y electroforético.

Determinación de Glucosa por el Método de Glucosa Oxidasa (GOD-PAP).

Fundamento:

La glucosaoxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa según la ecuación siguiente:



El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción, reacciona en presencia de peroxidasa (POD) con 4 aminoantipirina y 2,4 diclorofenol. Por copulación oxidante se forma antipirilquinonimina roja. La cantidad de colorante formado es proporcional a la concentración de glucosa.

Método.

Disolver el contenido de un frasco de reactivo de color en 100 mls. de agua destilada.

Emplear el plasma de las muestras de individuos sanos y diabéticos.

Colocar en tubos de ensaye los reactivos de la siguiente manera:

	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Plasma Problema	-----	-----	0.10 mls.
Sol. Patrón	-----	0.10 mls.	-----
Mezcla Reactiva	2.0 mls.	2.00 mls.	2.0 mls.

Mezclar y dejar reposar 30 min. a temperatura ambiente. Evitar la luz directa del sol.

Leer la absorción de los problemas y el patrón frente al blanco a 510 nm.

Realizar el cálculo de concentración de glucosa:

$$\frac{\text{Absorción del problema}}{\text{Absorción del patrón}} \times 100 = \text{mg/dl.}$$

Valores de Referencia: 50 - 100 mg/dl.

Determinación Colorimétrica de HbG.

Obtener muestras de sangre venosa de individuos sanos y diabéticos, empleando EDTA como anticoagulante.

Separar los glóbulos rojos por centrifugación durante 10 min. a 3000 rpm. , lavar tres veces con solución salina isotónica.

Colocar en un tubo de ensaye 2 mls. de glóbulos rojos, un volumen igual de agua destilada y 1/2 volumen de CCl_4 , agitar vigorosamente 5 min.

Dejar reposar y eliminar los residuos celulares con centrifugación 10 min. a 1000 rpm.

Colocar 2 mls. del hemolizado y 1.0 ml. de ácido oxálico 0.3 N en tubos con tapón de baquelita e incubar durante 1 hr. en autoclave a 18 ± 1 lb. de presión, enfriar a temperatura ambiente.

Adicionar 1 ml. de TCA al 40% y mezclar vigorosamente. Centrifugar 10 min. a 5000 rpm.

A 2 mls. del sobrenadante añadir 0.5 mls. de TBA 0.05 M, excepto a la muestra que se empleará como blanco. Incubar 10 min. a 40°C .

Leer la absorción a 443 nm.

Realizar el cálculo de % HbA_1 , tomando en consideración que una absorción de 0.029 corresponde a 1% de HbA_1 en el hemolizado.

Determinación Electroforética de HbG.

De las muestras de sangre venosa empleadas para la determinación colorimétrica, mezclar volúmenes iguales de sangre y solución salina para lavar los glóbulos rojos.

Centrifugar las células lavadas a 3000 rpm. durante 10 min. y eliminar la salina del paquete celular.

Colocar 0.05 mls. del paquete de glóbulos rojos en un tubo de ensaye, lisar con adición de 0.45 mls. de -- agua destilada, mezclar suavemente y dejar reposar durante 10 min. para asegurar la lisis completa.

Disolver un frasco de amortiguador Glyco-Phore en agua destilada y aforar a un volumen final de 1000 mls. Colocar un volumen de 400 mls. de esta solución en la - cámara de electroforesis.

Humectar la membrana de acetato de celulosa en el - amortiguador durante 5 min., eliminar el exceso de amortiguador mediante el uso de papel secante. Introducir la membrana en el puente de electroforesis, colocar el puente en la cámara que contiene el amortiguador, tapar la - cámara, conectar los electrodos en la fuente de poder negro con negro, rojo con rojo, ajustar el voltaje a 150 V pasar la corriente durante 15 min.

Transcurrido ese tiempo apagar la fuente de poder, - abrir la cámara.

Cargar el aplicador llenando con las muestras correspondientes los pozos del aplicador, utilizando un tubo capilar.

Colocar el aplicador sobre su base y presionar el botón de aplicación con suavidad durante 10-15 seg. Soltar el botón suavemente.

Transferir el aplicador a el puente de electroforesis y realizar la aplicación de las muestras a la membrana con presión del botón durante 25 seg.

Tapar la cámara de electroforesis y conectar los -- electrodos a la fuente de poder, aplicar un voltaje de - 150 V durante 45 min.

Limpiaar el aplicador y su base inmediatamente.

Realizado el corrimiento electroforético retirar la membrana del puente con unas pinzas, e introducirla en el colorante Ponccau 10 min.

Retirar la membrana del colorante, lavar la membrana en solución de ácido acético al 5%, realizar los lavados sucesivos hasta que la solución final del lavado sea incolora, lo cual requiere un tiempo total de aproximadamente 10 min.

Después del lavado final introducir la membrana en solución aclarante durante 3 min. Retirar y eliminar el exceso de solución colocando la membrana en una placa de vidrio con papel absorbente y deslizar sobre ella una segunda placa de vidrio con un ángulo de 45°.

Transparentar la membrana colocándola en una estufa a 80-90°C durante 10-15 min.

Leer las fracciones así separadas en el densitómetro a 525 nm.

Obtención de Regresión y Correlación Lineales Simples.

El análisis de regresión es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables y , --- cuando se emplea este método de análisis, el objetivo -- final por lo general, es predecir o estimar el valor de -- una variable, correspondiente a un valor dado de la otra variable.

Por otra parte, el análisis de correlación se refiere a la medición de la intensidad de la relación entre -- las variables. Cuando se calculan medidas de correlación a partir de un conjunto de datos, el interés se centra -- en el grado de correlación entre las variables.

En el modelo de regresión lineal simple interesan -- dos variables, X y Y . Por lo general, a la variable X -- se le conoce como variable independiente, como consecuencia, a la otra variable Y se le da el nombre de variable dependiente y se habla de la regresión de Y sobre X .

Un primer paso, que por lo común es útil al estudiar la relación entre dos variables es preparar un Diagrama de Dispersión de Datos. Los puntos estarán situados asignando valores de la variable independiente X al eje horizontal y los valores de la variable dependiente Y al eje vertical. Por lo general, el patrón obtenido -- mediante los puntos situados en el Diagrama de Dispersión sugiere la naturaleza básica de la relación entre las dos variables. Sin embargo al surgir la cuestión de cuál recta describe mejor la relación entre las varia--

bles. No puede obtenerse una respuesta para esta cuestión inspeccionando las rectas. Por lo que se requiere algún método para obtener la recta deseada.

El método que por lo común se emplea para obtener la recta deseada se conoce como Método de los Mínimos Cuadrados y la recta resultante se denomina Recta de los Mínimos Cuadrados.

La ecuación general para la recta está dada por:

$$y = a + bx$$

donde "y" es un valor sobre el eje vertical, y "x" es un valor sobre el eje horizontal, "a" es el punto donde la recta se eleva por cada unidad de incremento en "x". A "a" se le da el nombre de ordenada al origen y a "b" el de pendiente de la recta.

"a" y "b" puede obtenerse resolviendo simultáneamente las dos ecuaciones siguientes, las cuales se les conoce como ecuaciones normales para un conjunto de datos:

$$\sum y_i = na + b \sum x_i$$

$$\sum x_i y_i = a \sum x_i + b \sum x_i^2$$

Una vez obtenida la ecuación de regresión, debe evaluarse para determinar si describe adecuadamente la relación entre las dos variables y si puede usarse de manera efectiva con fines de predicción y estimación (55,56).

El coeficiente de Determinación de la muestra mide la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión de la muestra a los valores observados de Y. Sin embargo, no se puede llegar a un juicio final acerca de la ecuación hasta que no se ha sometido una prueba estadística más objetiva. Esa prueba se realiza por medio de un Análisis de Varianza cuya tabla se señala a continuación:

TABLA DE ANADVA PARA LA REGRESION LINEAL SIMPLE.

Fuente de Variación	SC	g.l.	C.M.	R.V.
Regresión lineal	SC _{explicada}	1	SC _{exp} /1	CM _{exp} / CM _{inex}
Residual	SC _{inexplicada}	n-2	SC _{inex} /n-2	
Total	SC _{total}	n-1		

Al comparar el valor de R.V. obtenido con el valor crítico de F obtenido de tablas, de acuerdo a los grados de libertad g.l. = 1, se puede aceptar o rechazar -

El coeficiente de Determinación de la muestra mide la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión de la muestra a los valores observados de Y. Sin embargo, no se puede llegar a un juicio final acerca de la ecuación hasta que no se ha sometido una prueba estadística más objetiva. Esa prueba se realiza por medio de un Análisis de Varianza cuya tabla se señala a continuación:

TABLA DE ANADEVA PARA LA REGRESION LINEAL SIMPLE.

Fuente de Variación	SC	g.l.	C.M.	F.V.
Regresión lineal	$SC_{\text{explicada}}$	1	$SC_{\text{exp}/1}$	$CM_{\text{exp}}/$ CM_{inex}
Residual	$SC_{\text{inexplicada}}$	n-2	$SC_{\text{inex}/n-2}$	
Total	SC_{total}	n-1		

Al comparar el valor de F.V. obtenido con el valor crítico de F obtenido de tablas, de acuerdo a los grados de libertad g.l. = 1, se puede aceptar o rechazar -

que las variables están linealmente relacionadas.

El Coeficiente de Correlación de la población mide la intensidad de la relación lineal entre X y Y.

El Coeficiente de Correlación es la raíz cuadrada - del Coeficiente de Determinación de la población. El Coeficiente de Correlación describe la relación entre las - observaciones de la muestra, en dos variables, de la misma manera que el Coeficiente de Determinación describe - la relación en una población.

La ecuación del Coeficiente de Determinación es la siguiente:

$$r^2 = \frac{b^2(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2/n}{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/n}$$

Una fórmula alternativa para calcular el Coeficiente de Correlación (r) está dada por:

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i \sum y_i)}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}}$$

El valor de r fluctúa de 0 a 1. Entre mayor sea el valor de r existirá una mejor correlación entre las variables.

8. RESULTADOS

Se trabajó con dos poblaciones distintas, 100 individuos sanos y 150 individuos diabéticos, a los cuales se les determinó HbG mediante dos métodos de laboratorio distintos, colorimétrico y electroforético, las muestras fueron recolectadas en la Unidad de Medicina Familiar -- No.6 del IMSS, dichas muestras procedían de derechohabientes canalizados al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Unidad por el Servicio de Medicina Familiar.

La toma de muestra a los pacientes en ayunas se realizó a las 7 de la mañana, posteriormente las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la ENEP-Zaragoza para procesarlas el mismo día.

Población Control.

Se obtuvieron los Valores de Referencia para la población del oriente de la Ciudad de México considerada sana, por el método colorimétrico y electroforético para la determinación de HbG, siendo los resultados los reportados en el Cuadro No.1

Los criterios de inclusión fueron no presentar glucosa > 90 mg/dl y en la exploración física no presentar trastorno biológico evidente.

CUADRO No.1 VALORES DE REFERENCIA DE HbG OBTENIDOS EN LA POBLACION CONTROL.

METODO COLORIMETRICO	METODO ELECTROFORETICO
$\bar{x} = 12.07\%$	$\bar{x} = 1.77\%$
$\sigma = 3.61$	$\sigma = 0.69$
Rango= 8.46-15.68%	Rango= 1.08-2.46%

Población Diabética.

Aplicando los métodos a estudiar colorimétrico y electroforético se obtuvieron los siguientes resultados:

CUADRO No.2 VALORES DE REFERENCIA DE HbG OBTENIDOS EN LA POBLACION DIABETICA.

METODO COLORIMETRICO	METODO ELECTROFORETICO
$\bar{x} = 29.56\%$	$\bar{x} = 9.18\%$
$\sigma = 10.51$	$\sigma = 5.99$
Rango= 19.05-40.07%	Rango= 3.19-15.17%

CUADRO COMPARATIVO DE LOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS POR AMBOS METODOS PARA LAS DOS POBLACIONES.

P O B L A C I O N	M E T O D O	
	COLORIMETRICO	ELECTROFOPETICO
CONTROL*	$\bar{x} = 12.07\%$ $\sigma = 3.61\%$ Rango = 8.46-15.69%	$\bar{x} = 1.77\%$ $\sigma = 0.69$ Rango = 1.09- 2.46%
DIABETICA**	$\bar{x} = 29.56\%$ $\sigma = 10.51$ Rango = 19.05-40.07%	$\bar{x} = 9.18\%$ $\sigma = 5.99\%$ Rango = 3.19-15.17%

* Criterio de Inclusión; No presentar glucosa mayor de 90 mg/dl.

** Criterio de Inclusión; Presentar glucosa mayor de 150 mg/dl.

A continuación se indica en una Tabla de ANADEV de regresión lineal simple, la técnica estadística empleada para hallar la relación entre el Método Electroforético y el Método Colorimétrico en las dos diferentes poblaciones.

Así mismo, los valores HbG para ambas poblaciones obtenidos por el Método Colorimétrico y Electroforético se muestran en las gráficas No. 1 y 2 , donde se señala la \bar{x} y σ para cada uno de ellos.

TABLA DE ANADEVIA PARA LA REGRESION LINEAL SIMPLE
P O B L A C I O N N O R M A L

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F _{cal.}
reg	1	$SC_r = \sum (y - \hat{y})^2$ $= m \sum (xy) + b \sum y - [(\sum y)^2 / n]$ $= \underline{1012.329}$	SC _r /gl	$\frac{MC_r}{MC_{cr}} = \underline{340.92}$
error	n-2	$SC_e = \sum (\hat{y} - \bar{y})^2$ $= \sum y^2 - m \sum (xy) - b \sum y$ $= \underline{291.0049}$	SC _e /gl e	$= \underline{2.9694}$

F_{crit} = (1, n-2, 0.05) F_{crit} = 4.00

Si F_{cal} > F_{crit} Hay asociación entre variables *****

Si F_{cal} < F_{crit} No hay asociación entre variables *****

340.92 > 4.00

b = $\frac{\sum y - m \sum x}{n} = \underline{3.9168}$
m = $\frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)} = \underline{4.6067}$

r = $\frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}} = \underline{0.8813}$ *****

$\sum xy = 2356.32$
 $\sum n = 100$
 $\sum x = 1207.08$
 $\sum x^2 = 177$
 $\sum y^2 = 15873.8906$
 $\sum x^2 = 361$
 $(\sum y)^2 = 1457042.126$
 $(\sum x)^2 = 31329$

x = METODO ELECTROFORETICO

y = METODO COLORIMETRICO

TABLA DE ANADAVA PARA LA REGRESION LINEAL SIMPLE.
POBLACION DIABETICA

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F _{cal.}
reg	1	$SC_r = \sum (y - \hat{y})^2$ $= \sum \xi(xy) + b \sum y - [(\sum y)^2 / n]$ $= 15018.8403$	SC _r /gl r	$\frac{MC_r}{MC_{er}} = 1423$
error	n-2	$SC_e = \sum (\hat{y} - \bar{y})^2$ $= \sum \xi y^2 - m \sum \xi(xy) - n \bar{y}^2$ $= 1562.342$	SC _e /gl e	$= 10.55$

F_{crit} = (1, n-2, 0.05) F_{crit} = 3.92

Si F_{cal} => F_{crit} Hay asociación entre variables *****
 Si F_{cal} < F_{crit} No hay asociación entre variables 1423 > 3.92

b = $(\sum y - m \sum x) / n = 14.23$

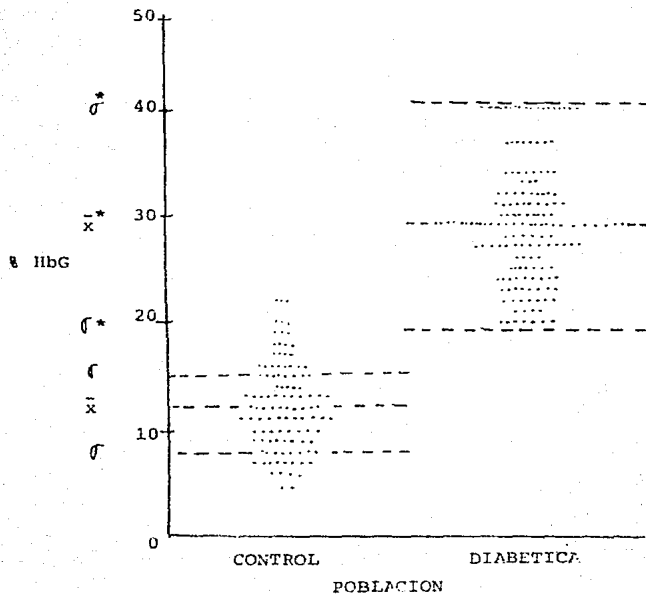
m = $(n \sum xy - \sum x \sum y) / (n \sum x^2 - (\sum x)^2) = 1.67$

r = $\frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} = 0.95303$ *****

$\sum xy = 49642.10$
 $n = 150$
 $\sum y = 4432$
 $\sum x = 1375$
 $\sum y^2 = 147532.009$
 $\sum x^2 = 18001$
 $(\sum y)^2 = 19642624$
 $(\sum x)^2 = 1890625$

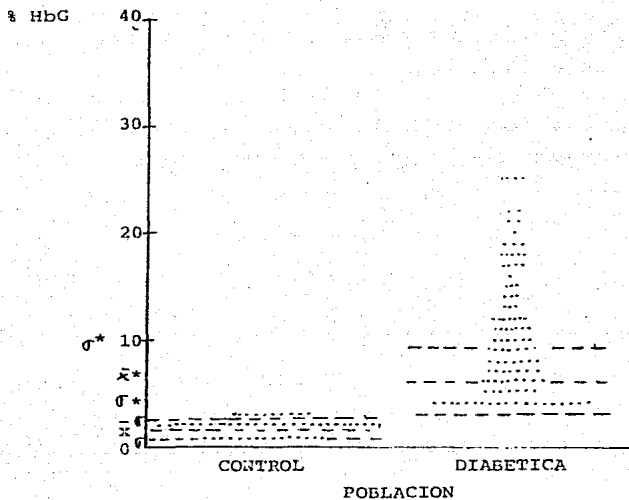
x = METODO ELECTROFORETICO
 y = METODO COLORIMETRICO

CUADRO No.1 VALORES DE HbC OBTENIDOS
POR EL METODO COLORIMETRICO.



\bar{x}^* y σ^* Corresponden a la población diabética.

CUADRO No. 2 VALORES DE HbG OBTENIDOS POP EL METODO ELECTROFORETICO.



\bar{x}^* y σ^* Corresponden a la población diabética.

9.0 DISCUSION: DE RESULTADOS.

Se obtuvieron valores de referencia para HbC por -- dos métodos de laboratorio, colorimétrico y electroforético en dos poblaciones, una control y otra de pacientes diabéticos, estos valores son mayores a los reportados - en la Bibliografía para individuos Norteamericanos (5,11, 17), debido a que se trata de dos poblaciones distintas, en cuanto a factores alimenticios, culturales y socioeco- nómicos.

Es importante señalar que se trabajó con una pobla- ción del oriente de la Ciudad de México con un nivel so- cioeconómico predominantemente bajo y por tanto, con caracte- rísticas que conllevan a una alimentación no balanceada, en particular hiperhidrocarbonada.

Por el método colorimétrico se obtuvieron valores - más altos que por el método electroforético, debido a -- que se ha reportado que cuantifica glucosa libre que in- terfiere en la determinación, siendo el método electrofo- rético más sensible.

La limitada posibilidad de disponer de Acido Tiobar- bitúrico utilizado en la determinación de HbC por el mé- todo colorimétrico, condujo a la necesidad de realizar - su síntesis en el Laboratorio de Investigación de Quími- ca Orgánica de la ENEP-Zaragoza.

Debido a la poca disponibilidad del 5-HMF, así como por la variación en la estabilidad de las soluciones di-

luías del mismo, no se construyó la curva de calibración, sin embargo, con base en los estudios de estabilidad reportados para el 5-HMF en curvas de calibración, (31,44,46,47), el % de HbG determinado por el método -- colorimétrico fue calculado considerando, que 1% de HbG proporciona una absorción de 0.029 (43-45).

Fue preciso realizar la determinación de HbG en una población de individuos sanos, a la que se denominó población control, dado que los valores de HbG inicialmente obtenidos por el método colorimétrico en individuos diabéticos eran mayores a los reportados en la bibliografía, de esta manera, se establecieron valores propios de referencia en individuos sanos y diabéticos.

El patrón de HbG (46-54), se realizó para obtener -- como referencia la separación de las dos bandas características de HbA y HbA₁, por la necesidad de contar con -- patrón de separación inicial.

La determinación de HbG en pacientes diabéticos de diferente tiempo de evolución, como un método de control al tratamiento de la Diabetes Mellitus, considerado un -- objetivo en este trabajo fue imposible realizarlo al no tenerse acceso a los expedientes de los pacientes.

La técnica estadística empleada para tratar de explicar la relación que existe entre el método colorimétrico y el método electroforético fue con lo siguiente:

a).- Regresión Lineal Simple donde se determinó la relación entre el método colorimétrico y el método electroforético, donde el método electroforético (x) corresponde a la variable independiente y el colorimétrico -- (y) corresponde a la variable dependiente.

b).- Además se utilizó la técnica del análisis de la varianza para la regresión, la cual es una poderosa herramienta estadística para explicar la relación entre las variables.

El desarrollo matemático se plantea a partir de dos regresiones y dos análisis de varianza cada una para --- muestras diabéticas y muestras normales.

Se ideó la forma de reporte tanto de los parámetros obtenidos para la regresión como para la Tabla de ANADVA para la regresión, el cual incluye, el criterio establecido con una confianza al 95% y una $\alpha = 0.05$

Como lo demuestran los valores de desviación standar los dos métodos tienen un grado de dispersión muy bajo lo que indica que existe precisión en los métodos.

También, como se puede observar al graficar los valores de HbG y esquematizar sus respectivas \bar{x} y se aprecia que no existe traslape entre los valores de los mismos.

10. CONCLUSIONES

Los valores de referencia de HbG obtenidos para el método colorimétrico, de una población del oriente de la Ciudad de México, considerada como sana es de 8.5-10% y para el método electroforético es de 1-2.5%, mientras que los valores reportados en la bibliografía son de 5 a 8% y del 3 a 4% respectivamente para cada uno de los métodos (5,11,17).

Los valores de referencia de HbG para pacientes diabéticos de una población del oriente de la Ciudad de México, es de 10-40% para el método colorimétrico y del 3-15% para el método electroforético, en comparación con los indicados en la bibliografía, método colorimétrico - 10-20% o más y 10-20% para el método electroforético (5, 11,17).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede afirmar que tanto en la ANADEVA - como en la regresión lineal, el método electroforético y colorimétrico cuando están sujetos a niveles altos de -- glucosa tienen una mejor correlación, y podemos decir, -- que el coeficiente de correlación cuadrático es bastante bueno, y corresponde al 0.95303, a parte, el valor de -- F_{cal} de la Tabla de Análisis de la Varianza para la Regresión es muy superior a la F_{crit} o de tablas 1423 > 3.92, por lo tanto corroboramos que existe una alta asociación entre las variables.

Por lo que a partir de esta información y con una -

confianza al 95% y una $\alpha = 0.05$ podemos elegir indistintamente cualquiera de los dos métodos, siempre y cuando sea realizado en las mismas condiciones que en el presente trabajo.

11. A P E N D I C E

Sistema Amortiguador de Bicarbonatos.

Colocar los siguientes reactivos en un matraz aforado de 100 mls.:

Reactivos	Cantidad
Bicarbonato de sodio	0.85 grs.
Carbonato de sodio	0.15 grs.
Agénina	0.0135 grs.
Fosfato trisódico	0.0163 grs.
Manitol	0.0091 grs.
Glucosa	0.90 grs.
Penicilina Potásica	0.0038 grs.
Sulfato de Estreptomicina	0.005 grs.

Aforar con agua destilada a 100 mls.

Solución Salina Isotónica.

Disolver 0.85 grs. de NaCl en 100 mls. de agua destilada.

Solución de Cianuro de Potasio 4%.

Disolver 4 grs. de KCN en 100 mls. de agua destilada.

Solución Amortiguadora de Fosfatos.

Solución Concentrada A.

Disolver 27.6 grs. de fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. (Sol. 0.2 M).

Solución Concentrada B.

Disolver 28.39 grs. de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4 ó 53.62 grs. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada (Solución 0.2 M también). Mezclar los volúmenes de soluciones concentradas que se mencionan en el cuadro siguiente, y aforar a 200 mls. para obtener los valores correspondientes de pH.

mls. Sol. A	mls. Sol B.	pH final.
19.00 mls.	81.00 mls.	7.4
33.00 mls.	67.00 mls.	7.1

Solución Amortiguadora de fosfatos-glicerol (2:8).

Mezclar 10 mls. de Solución Amortiguadora de fosfatos -- pH 7.1 y 40 mls. de glicerol.

Solución de ácido oxálico 0.3 N.

Disolver 6.712 grs. de ácido oxálico en 100 mls. de agua destilada.

Solución Acido Tiobarbitúrico 0.05 N.

Disolver 0.1442 grs. de ácido tiobarbitúrico en 20 mls. de agua destilada. Agitar vigorosamente hasta obtener disolución completa.

Reactivo Cualitativo de Benedict.

Disolver 100 grs. de carbonato de sodio anhidro y 173 - grs. de citrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en unos 700 - mls de agua destilada.
Disolver 17.3 grs. de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en unos 100 mls. de agua destilada y vertir esta solución en la de carbonato-citrato con agitación constante. Aforar a un litro de agua destilada.

Solución Acido Tricloroacético 40%.

Disolver 40 grs. de ácido tricloroacético en 100 mls. de agua destilada.

Prueba Cualitativa de Benedict.

Esta prueba no es específica de los azúcares y resulta positiva con casi cualquier sustancia reductora, si se encuentra en grandes cantidades.

Método.

En un tubo de ensaye colocar 0.5 mls. (10 gotas) de la solución a analizar y 5.0 mls. de reactivo cualitativo de Benedict. Mezclar y poner a baño maría de agua hirviente durante 5 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente y leer:

Color	Resultado
Azul	Negativo
Azul verdoso	Hs (Huellas)
Verde	+ aprox. 0.5% de sustancia reductora
Pardo verdusco	++ aprox. 1.0% " " "
Amarillo	+++ aprox. 1.5% " " "
Rojo ladrillo	++++ aprox. 2.0% " " "

12. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Goldstein D.E., et. all. Glycated Hemoglobin: Methodologies and Clinical Applications. Clin.Chem. 1986 32;108:64-70.
- 2.- Goldstein D.E. Is Glycosylated Hemoglobin Clinically useful?. N.Eng.J.Med. 1984;310:384-5.
- 3.- Nathan D.M., et. all. The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay. N.Eng.J.Med. - 1984;310:341-6.
- 4.- Mortensen B.B. Glycosylated Hemoglobin. D.M.B. 1985 32;6:309-28.
- 5.- Bunn F.H., et. all. The Glycosilation of Hemoglobin: Relevance to Diabetes Mellitus. Science 1978 208;7: 21-7.
- 6.- Bunn F.H., et. all. The Biosynthesis of Human Hemoglobin A_{1c}. J.Clin.Inv. 1976;57:1652-9.
- 7.- Gareil M.C., et. all. HbA_{1c}: A Review on its Structure, Biosynthesis, Clinical Significance and Methodos of Assay. Biomedicine 1979;30:234-40.
- 8.- Garlick L.H., et. all. Characterization of Glycosylation Hemoglobins. J.Clin. Inv. 1983;71:1062-72.
- 9.- Welch S.G., et. all. A Paper Micro-Scale Method for the Measurement of Hemoglobin A_{1(a+b+c)}. Diabetologia 1979;14:209-11.
- 10.- Lenzi S., et. all. The Clinical Usefulness of Glycated Hemoglobin in Monitoring Diabetes Mellitus. Clin. Chem. 33,1:55-6 1987.
- 11.- Gelman Sciences Glyco-Phore Buffer. For Quantitative Determination of Glycosylated Hbs (HbA_{1c}) by Electrophoresis.

- 12.- Read Ann., et. all. Assessment of a Simple Electrophoretic Method for Measuring HbA_{1c}. Clin. Chem. Acta 1980;108:487-91.
- 13.- Weykarp. W.C., et. all. Mechanism and Speed of Reactions between Haemoglobin and Glucose. Clin. Chem. Acta. 1982;125:341-50.
- 14.- Higgins O.J., et. all. Kinetic Analysis of the Nonenzymatic Glycosylation of Hemoglobin. J.Biol.Chem. 1981 256,10:5204-08.
- 15.- Saleh A.K., et. all. An Automated Liquid Chromatographic System for Convenient Determination of Hemoglobin A_{1c}. Clin. Chem. 1985 31;11:1872-8.
- 16.- Bacchus R. The Measurement and Clinical Significance of Glycated Hemoglobin. Lab. Medica 3;4:32-5.
- 17.- Bunn F.H. Evaluation of Glycosylated Hemoglobin in Diabetic Patients. Diabetes 1981; 30:613-7.
- 18.- Menard L. et. all. Quantitative Determination of Glycosylated Hemoglobin A_{1c} by Agar Electrophoresis. Clin. Chem. 1980 26;11:1598-1602.
- 19.- Poulsen J., et. all. A comparison of the Determination Haemoglobin by Isoelectric Focusing and Cation Exchange Chromatography on minicolumns. Scand.J. Clin.Lab. Invest. 1986; 46:859-63.
- 20.- Little R.R. et. all. Collection of Blood on Filter Paper for Measurement of Glycated Hemoglobin by Affinity Chromatography. Clin. Chem. 32;5:869-71 1986.
- 21.- Panuh-Ontto R. Determination of Hemoglobin A_{1c} by Liquid Chromatography. Clin. Chem. 1988 34;1621.
- 22.- Hoak S.K., et. all. Automated Procedure for Reading and Calculating Glycated Hemoglobin in the Diabetes Mellitus Control and Complications Trial. Clin. Chem. 1987 33; 12:2305.
- 23.- Goldstein D.E., et. all. Feasibility of Centralized Measurements of glycated Hemoglobin in the Diabetes Mellitus. Clin. Chem. 1987 33;12:2267-71.

- 24.- Larsen M.L. Evaluation of a New Capillary Blod Co--
llection System for Laboratory Assay of Glycated --
Haemoglobin. Scan.J.Clin.Lab.Inv. 1986 46:315-17.
- 25.- Eros J., et. all. Glycated Hemoglobin Measurement -
in Dried Blood on Filter Paper. Clin.Chem. 1986 --
32;12:2222.
- 26.- Little R.R., et. all. More on Clycated Hemoglobin -
Measurement for Samples Dried on Filter Paper. Clin.
Chem. 33;5:741 1987.
- 27.- Klein R., et. all. Glycosylated Hemoglobin in a po-
pulation-Based Study of Diabetes. A.J.Epidemiology
126;3:415-28.
- 28.- Nathan D.M., et. all. Two Commercial Methods Evalua-
tics for Eliminating the Labil Fraction from the --
Assay for Clycated Hemoglobin. Clin. Cnem. 30;1: -
109-10 1984.
- 29.- Aleyassine H., et. all. Agar Electrophoretic Deter-
mination of Glycosylated Hemoglobin: Effect of Va--
riant Hemoglobin, Hiperlipidemia y temperature. Clin.
Chem. 1981 27;3:472-5.
- 30.- Gelman Science. Glycosylated Hemoglobin Buffer.
- 31.- Parker K.M., et. all. Improved Colorimetric Assay -
for Glycosylated Hemoglobin.Clin.Chem. 1981 27;5:
669-672.
- 32.- Little R.R., et. all. Interlaboratory Standarita--
tion of Glycated Hemoglobin Determinations. Clin. -
Chem. 1986 32;2:358-60.
- 33.- Mullins R.E., et. all. Sensitivity of Isoelectric FO-
cusing, Ion Exchange, and Affinity Chromatograph to
Labile Glycated Hemoglobin. Clin. Chem. 1986 32;8:
1460.
- 34.- Little R.R. et. all. Effects of Whole Blood Storage
on Results for Glycosylated Hemoglobin Compared ---
Screening Test for Diabetes Mellitus. Clin. Chem. --
1983 29;6:1113-5.
- 35.- Forrest R.D., et. all. Four Assay Method for Glyca-
ted hemoglobin. Clin. Chem. 1988 34;1:145-8.

- 36.- Little R.R., et. all. Relationship of Glycosylated Hemoglobin to Oral Glucose Tolerance. Diabetes 37: 60-4 1988.
- 37.- Matsubara L.S., et. all. Comparamento de Hemoglobina Glicosilada (HbA_{1c}) e glicemia de jejum em indivíduos normais e portadores de "Diabetes mellitus". Rev. Ass.Med.Brasil 1985 31;11:227-31.
- 38.- Grandis A.S., et. all. Gestational Diabetes: Maternal response to diet and insulin therapy as reflected by glycosylated hemoglobin concentration. Am.J.Obst. Gynecol. 1975;1118-21.
- 39.- Brutsman L., et. all. Verified self-monitored blood glucose data versus glycosylated hemoglobin and glycosylated serum protein as a means of predicting -- short and long-term metabolic control in gestational diabetes. Am.J.Obst. Gynecol. 156;5:1096-1100 1987.
- 40.- Ket. T.C., et. all. Predictive Value of early pregnancy glycohemoglobin in the insulin treated diabetic patient. 157;3:699-703 1987.
- 41.- Morris M.A., et. all. Glycosylated Hemoglobin. A sensitive indicator of Gestational Diabetes. Obstetric Gynecol. 68:357-61 1986.
- 42.- Bacon G.E., et. all. Evaluation of Glycosylated Hemoglobin in the management of young patients with insulin dependent Diabetes Mellitus. Journal of Adolescent Health Care 1986 7:187-90.
- 43.- Abraham E.C., et. all. Determination of the Glycosylated Hemoglobins (HbA_{1c}) with a New Column Procedure. Diabetes 27;9:931-37 1978.
- 44.- Ezcurra F.F. Montaje y estandarización de la determinación colorimétrica de Hb Glicosilada. Rev. Cub. Med. 1986 25:660-66.
- 45.- Fischer R.W., et. all. The Colorimetric Determination of HbA_{1c} in normal and diabetic subjects. Clin. Lab. Haematol. 1980 2:129-38.
- 46.- Nicol D.J., et. all. A simplified colorimetric method for the measurement of Glycosylated Hemoglobin. Pathology 1983 15:443-7.

- 47.- Esias P.V. Probable Glicatación no enzimática in vitro de la calmodulina de testículo de toro. ENEP-Za ragosa UNAM 1988.
- 48.- Spicer K.N., et. all. Synthesis of Hemoglobin A_{1c}. FEBS Letters 1976 71:2;356-60.
- 49.- Ney K., et. all. In vitro preparation of noenzimatically Glycosylated Human, Transferrin, Macroglobulin and fibrinogen with preservation of function. Diabetes 1985 34:251-55.
- 50.- Fluckinger R. et. all. Synthesis de Hemoglobin A_{1c} and Related Minor Hemoglobins by Erythrocytes. J.Clin.Invest. 1979 64:40-48.
- 51.- Agarwal K.C., et. all. Noenzimatic Glycosylation of Eritrocitic Proteins in Normal and Diabetic Subjects. Diabetes 1985 34:251-55.
- 52.- Cabbay K.N., et. all. Noenzimatic Glycosylation of Rat Albumin. J.Biol. Chem. 1979 254:19:9394-9400.
- 53.- Day J.F., et. all. Glycosylation Hemoglobins: Increased of Glicosylation of Hemoglobin A in Diabetes patients. Diabetes 1979 28:337-40.
- 54.- Smith R.J., et. all. Regulation of Hemoglobin A_{1c} formation in Human Erythrocytes in vitro. J.Clin. Inv. 69:1164-68 1982.
- 55.- Wayne Daniel. Bioestadística. Ed. Limusa. 1a. Edición. México D.F. 1983. pag. 291 a 313.
- 56.- Bethea R. et. all. Statistical Methods. Ed. Walcer - Dekfer. 1a. Edición 1975 New York N.Y.